

# 心外膜在心肌损伤后心肌再生中的作用

李忠鑫<sup>1,2,3\*</sup>, 陈雪英<sup>2</sup>, 甘立军<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>济宁医学院临床医学院, 山东 济宁

<sup>2</sup>济宁市心血管疾病诊疗重点实验室, 山东 济宁

<sup>3</sup>济宁医学院附属医院心内科冠心病四病区, 山东 济宁

收稿日期: 2022年11月26日; 录用日期: 2022年12月21日; 发布日期: 2022年12月29日

## 摘要

心外膜由单层间皮细胞组成, 它覆盖了心脏的最外层, 它的完整性和功能对于心脏的正常发育至关重要。作为血管生成和肌源性信号的中心, 以及发育心脏中间充质细胞和心肌细胞的来源, 心外膜具有在心肌梗塞后重新激活成熟心脏的巨大潜力, 这引起了人们对心外膜及其在心肌损伤后再生作用的极大兴趣。

## 关键词

心外膜细胞, 心肌再生, 损伤修复, 再生机制

# The Role of Epicardium in Myocardial Regeneration after Myocardial Injury

Zhongxin Li<sup>1,2,3\*</sup>, Xueying Chen<sup>2</sup>, Lijun Gan<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>Medical College, Jining Medical University, Jining Shandong

<sup>2</sup>Jining Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Diseases, Jining Shandong

<sup>3</sup>Four Wards of the Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

Received: Nov. 26<sup>th</sup>, 2022; accepted: Dec. 21<sup>st</sup>, 2022; published: Dec. 29<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

The epicardium is composed of monolayer mesothelial cells, which cover the outermost layer of the heart, and its integrity and function are essential for the normal development of the heart. As a

\*第一作者。

#通讯作者。

center for angiogenesis and myogenic signaling, as well as a source of developing heart mesenchymal cells and cardiomyocytes, the epicardium has great potential to reactivate a mature heart after myocardial infarction, which has raised great interest in the epicardium and its regenerative role after myocardial injury.

## Keywords

Epicardial Cells, Myocardial Regeneration, Damage Repair, Regeneration Mechanism

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,常可危及生命。尽管经皮冠状动脉介入治疗能及时恢复冠状动脉的通畅,但心肌恢复往往欠佳,导致广泛的心肌坏死。据报道,心外膜前体细胞可以分化为跳动的心肌细胞[1],心外膜是心脏的外层细胞层,作为血管生成和肌源性信号中心以及发育心脏中间充质细胞和心肌细胞的来源,心外膜具有在MI后重新激活成熟心脏的巨大潜力[2],因此近十年来,心外膜细胞已成为心肌梗死后心脏再生领域的研究热点[3]。而现有MI后治疗仅限于改善症状和减缓疾病的自然进展,不能弥补受伤后收缩性心肌的损失。目前,相关研究者已制定出几种修复心脏损伤的潜在方法,像诱导现存活性心肌细胞的增殖,通过移植心脏贴片进行治疗等等[4][5]。本文简要对常见心外膜促进心肌坏死后再生的过程作一综述,以期为临床治疗提供参考依据。

## 2. 心外膜细胞的形成与损伤后激活

### 2.1. 心外膜细胞的形成

心外膜由单层间皮细胞组成,它覆盖了心脏的最外层。心外膜起源于一群前体细胞,它们位于发育中的心脏的静脉极,称为前心外膜(PE)[6]。骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMP)和成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)信号参与PE的诱导。在鸡胚中,强的BMP信号通过p-Smad1/5/8促进内脏中胚层前体池的心肌分化,而弱的BMP信号刺激PE的形成。成纤维细胞生长因子信号通过pErk1/2负性调节PE区的BMP信号以促进PE的形成。PE形成后,PE细胞通过直接接触和/或通过释放游离细胞团(或包囊)进入心包腔,转移到心肌表面形成心外膜[7]。心外膜细胞通过上皮向间充质转变(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)事件从心外膜解放出来[8],并产生几种心脏细胞谱系,包括间质成纤维细胞和冠状动脉平滑肌细胞,它们构成心脏基质,为心肌提供氧气和营养[6][9][10]。

### 2.2. 心肌损伤后对心外膜的激活

在正常情况下,成体心外膜处于相对静默状态。当心肌受损时,心外膜对这种损伤反应快速而强烈。心脏损伤后,诱导心外膜细胞标记胚胎心外膜,增殖并覆盖损伤部位的基因表达,这一过程称之为激活。在斑马鱼中,整个心外膜在受伤后的1~2天内被激活,并表达抗衰蛋白、视黄醛脱氢2、Tbx18蛋白和肾母细胞瘤-1蛋白等蛋白[11]。WT1是一种转录因子,对心外膜组织祖细胞的形成很重要;主要为心脏成

纤维细胞和冠状血管平滑肌细胞, 较小范围的内皮细胞和心肌细胞[12]。心外膜来源细胞刺激心肌再生, 中胚层心脏系祖细胞的 Wt1 阳性 PE 细胞, 可分化成多种心脏细胞类型, 包括心脏成纤维细胞、血管平滑肌细胞、房室缓冲间充质细胞、内皮细胞甚至心肌细胞等[9]。早前进行去除斑马鱼心尖部的操作, 发现心外膜细胞可以迁移至心内膜继而协助心肌再生。

研究表明, 低氧是内皮细胞表达 Wt1 的触发因素, MI 模型小鼠的表达 Wt1+, 诱导 PE 分化为平滑肌细胞和血管内皮细胞以促进冠状动脉的重建[13]。但缺氧并不是 Wt1 表达的唯一触发因素, 胸腺肽  $\beta 4$  是一种氨基酸长肽, 通过表观遗传调控 WT1 启动子增强 MI 后的先天性心外膜反应[14] [15] [16], 并驱动 EMT, 最终增加新生血管和减少病理重塑[17] [18]。胸腺肽  $\beta 4$  处理成人心脏外植体后, 心外膜细胞被激活, 上调心外膜的 EMT 基因, 导致心外膜细胞动员和分化为心外膜来源的间充质细胞[19] [20]。

Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -Catenin)也参与了心外膜的激活[21]。Wnt 是一种与 Frizzled 型受体结合的配体, 并激活一个信号级联, 使  $\beta$ -Catenin 从其结合的肿瘤抑制蛋白 Apc 中释放出来[22]。因此,  $\beta$ -Catenin 可以作为一种转录因子移位到细胞核内, 促进细胞增殖。有学者研究发现, WT1 刺激细胞周期蛋白 D (Cyclin D) 的表达可能是介导细胞增殖的机制[12]。Cyclin D1 通过中间产物  $\beta$ -Catenin 在 Wnt-Frizzled 下游表达。其过程如下, 一旦 Wnt 与其受体 Frizzled 结合, 它就会激活  $\beta$ -Catenin, 从而诱导 Cyclin D1 的表达, 导致心外膜细胞的激活[22]。

### 3. 心外膜细胞的功能异质性

为了获得对心外膜细胞异质性的公正了解, 我们结合心外膜共聚焦显微镜和单细胞转录组, 在单细胞水平上表征了斑马鱼心外膜的发育转录组[23]。单细胞测序之后, 我们发现三个不同的心外膜细胞群[24], 这三个心外膜细胞亚群具有特定的遗传程序和独特的空间分布, 分别命名为 EPI1、EPI2 和 EPI3, 这些亚群体中的细胞以不同的方式表达 TCF21、TBX18 和 WT1B。EPI1、EPI2 和 EPI3 中的细胞表达了许多与上皮细胞命运息息相关的基因[25]。EPI1 中的细胞富集了与细胞粘附和上皮迁移相关的基因, 符合心外膜作为上皮细胞片迁移的能力[26]。EPI2 中的细胞表达参与血管收缩和参与心脏发育的细胞迁移, 提示它们可能在心外膜细胞层外完成功能。EPI3 细胞中白细胞迁移和轴突延伸相关基因富集, 提示它们可能引导非心外膜细胞进入发育中的心脏。

富含 EPI1 基因的谷氨酰胺转氨酶 2B (TGM2B) 对维持心外膜细胞层的完整性至关重要, 杂交链式反应(HCR)显示 TGM2B 转录广泛分布于心外膜, 体细胞敲除 TGM2B 导致心外膜细胞片出现缺陷。在严重病例中, 心外膜细胞层大面积缺失, 幼虫在敲除 TGM2B 基因后心外膜细胞数量也明显减少。以上结果表明 TGM2B 在维持心外膜形成中的完整性方面起着关键作用, 同时, EPI1 在心脏发育过程中确保心外膜细胞内聚上皮片的形成[25]。

EPI2 富集基因 *Sema3FB* 调节 TBX18+细胞的数量, 这些细胞对流出道平滑肌层有贡献[27]。我们对 *Sema3FB* 进行了体细胞诱变, 导致动脉球(BA)中 TBX18+细胞数量显著增加, 支持了 *Sema3FB* 在限制流出道中 EPI2 细胞数量方面的作用。我们研究这种功能是否可能与抑制 BA 中 TBX18+细胞增殖有关, 在 *SEMA3FB* 基因敲除后, 在 BA 内检测到更多 TBX18, 这一结果证明了 *SEMA3FB* 在限制细胞增殖方面的作用, 并提示它通过限制 TBX18+细胞从周围组织如心外膜的迁移来控制 BA 中的数量[28]。

富含 EPI3 的 *CXCL12A* 将白细胞吸引到发育中的心脏[29], HCR 结果显示, *CXCL12A* 的空间分布限于 BA 和心房之间的区域。*CXCL12A* 的体细胞丢失减少了存在于心脏表面的 PTPRC/CD45: DSRED+细胞的数量[30], 在后续体细胞 *CXCL12A* 敲除实验中, 与心外膜接触的 PTPRC/CD45: DSRED+细胞数量显著减少[31]。此外, 在 *CXCL12A* 突变幼虫中, 实验结果与体细胞 *CXCL12A* 敲除实验一致, 由此确定了 *CXCL12A* 利用化学吸引诱导白细胞到发育心脏表面上的作用。

## 4. 心外膜修复损伤心肌与血管的信号通路

心外膜已被提出可以在胚胎心脏发育和成人心脏再生期间刺激心肌细胞增殖, 相关确切机制仍在研究与探索之中。心外膜也有助于细胞外基质成分和生长因子维持心脏组织结构和电生理特性, 其中多种信号通路介导心外膜和心肌之间的相互作用[18]。

### 4.1. TGF $\beta$ 信号

在健康的心脏中, 转化生长因子(TGF)  $\beta$  由心肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞释放[32]。TGF $\beta$  家族成分在发育和疾病过程中至关重要, 因为其蛋白参与了必要的细胞过程的调节, 包括增殖、分化、粘附和凋亡[33] [34]。TGF $\beta$  有三种配体, TGF $\beta$ 1、 $\beta$ 2 和  $\beta$ 3, 它们都在心脏中表达, 并在心脏病条件下上调。TGF $\beta$ 1 基因敲除会导致心脏和肺的过度炎症反应, 从而导致死亡。TGF $\beta$ 2 基因敲除的结果并不典型, 是由于 EMT 过程受损而导致广泛的器官缺陷。TGF $\beta$ 3 基因敲除小鼠没有心脏表型, 但它们表现出腭融合缺陷, 导致腭裂。心肌缺血损伤后, TGF $\beta$ 1 和  $\beta$ 2 早期上调, 而 TGF $\beta$ 3 表现出延迟和持续的诱导[35]。

### 4.2. PDGFR $\beta$ 信号

斑马鱼心脏再生需要 PDGFR $\beta$  信号通路, 对哺乳动物心脏损伤的研究也表明 PDGFR $\beta$  可能起重要作用。我们构建了新生小鼠 MI 模型并对心脏样本进行了检测, 发现心脏损伤后 PDGFR $\beta$  及其磷酸化水平均显著升高[36]。在大多数心血管疾病模型中, 我们观察到 PDGF 信号传导中 PDGFR $\beta$  的表达明显强于 PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$  通过调节间充质干细胞的迁移、增殖和分化参与血管新生和组织修复, 而哺乳动物的心外膜恰好为间充质干细胞组织在心脏发育、稳态和损伤修复中发挥积极的作用[37]。

### 4.3. VEGFA 通路

研究表明, 心肌细胞的增殖是依赖巨噬细胞的, 巨噬细胞被招募到心外膜 - 心肌壁龛, 并诱导心外膜细胞数量的扩大, 从而增加了 VEGFA 的表达。心脏损伤和 VEGFA 增加了心内膜切迹信号和心肌细胞数量, 证明了一种巨噬细胞通过刺激心外膜 VEGFA 的表达来刺激心肌细胞增殖的机制。而心外膜则通过增殖和增强 VEGFA 的表达来激活和响应损伤。很可能 VEGFA > Notch > NRG-ErbB (研究证明 Notch 信号和 NRG-ErbB 信号在未损伤和损伤的幼虫心脏中都是心肌细胞数量扩张所必需的)是一种发育中的心脏生长途径, 在心肌损伤后上调, 并且巨噬细胞作用于这一途径的上游[38]。

### 4.4. PRMT1-P53 通路

EMT 是由一个信号通路网络启动的, 包括转化生长因子 B (TGF-B)、血小板衍生长因子(PDGF)和 Wnt 信号通路, 这些信号通路汇聚于关键转录因子如 Snail 和 Slug 以实现转录重编程, 从而导致形态学改变以及细胞迁移[39]。有研究揭示, 在心脏发育过程中蛋白精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1)-P53 通路是心外膜侵袭和心外膜来源谱系形成所必需的[40]。利用单细胞测序技术, 发现 PRMT1 在心外膜中特异性缺失时降低了心外膜源性细胞系中基质和核糖体基因的表达。PRMT1 的丢失导致 p53 的积累, 从而促进 Slug 降解并阻断 EMT。后续实验证明, 在删除心外膜中的 PRMT1 及其细胞衍生物后, 显著改变了心外膜侵袭的轮廓。研究使用心外膜来源的心脏成纤维细胞所走的距离来测量侵袭: PRMT1 缺陷小鼠的成纤维细胞主要分布在外周心外膜 75 mm 范围内, 而对照组和 p53 降低的 PRMT1 缺陷组的成纤维细胞分布范围为 150 mm [41]。以上结果得出, 降低 PRMT1 缺失的心外膜细胞中的 p53 可以很大程度上挽救心外膜的侵袭, 从而恢复心脏成纤维细胞、冠状血管平滑肌细胞和周细胞的形成, 并且促进心室形态的发生。

## 5. 心外膜在心肌修复治疗中可能的应用

### 5.1. 心外膜共移植

再生医学可能是有效治疗心力衰竭的关键，利用干细胞衍生的心血管细胞和组织来恢复完全的收缩功能，人胚胎干细胞(HESC)衍生的心肌细胞(CMS)已成功地用于 MI 后治疗。HESC 衍生的心外膜细胞和心肌细胞的共移植使移植物的心肌细胞在体内的增殖速度增加了一倍，导致心脏移植物的尺寸增加了 2.6 倍，同时增加了移植物和宿主的血管。这些改变伴随着细胞外基质的重塑，包括高水平的纤维连接蛋白沉积。最后，HESC 衍生的心外膜与 HESC-CMS 共同输送可显著改善梗死后心室功能。与间充质基质细胞相比，心外膜细胞显著增强了人工化心脏组织的收缩力、肌原纤维结构和钙处理，同时降低了被动僵硬。心外膜细胞增强心脏移植物大小和功能的能力使其成为一种有希望的修复辅助治疗手段[9]。

### 5.2. CDC 移植

心球源性细胞(Cardiosphere-derived cells, CDCs)构成心脏干细胞库，是治疗 MI 的一种有前景的治疗手段。我们直接从成年小鼠心外膜中分离出 CDC，命名为原发性心外膜衍生 CDC (primary epicardium-derived CDCs, PECDC)，PECDC 在体外高表达 T-box 转录因子 18 (Tbx18)，Tbx18 被证明是在心脏发育过程中产生多种心血管细胞类型的祖细胞，永生化的 PECDCs 移植显著促进了心肌发生并改善了小鼠 MI 后衰竭心脏的左心室功能[42]。

### 5.3. 贴片移植

在 MI 和心力衰竭的小鼠模型中，心外膜贴片(ECM)治疗显示出显著改善心功能，极大地保留了心肌结构，减轻了室壁瘢痕，并显著限制了组织损伤。心耳微移植物(AAMS)可能通过旁分泌机制诱导了缺血亚区的代谢从氧化代谢向糖酵解代谢的转变，AAMS 选择性地增加了与肌肉形成、血管发育和谷胱甘肽代谢相关的蛋白的表达，可以通过促进心肌功能恢复的方式调节心肌梗死后的炎症反应。作为一种机械支持结构，心外膜 ECM 补片也可以有效地改变衰竭左室的生物力学。通过增加壁厚，ECM 补片移植可以缓解心肌壁的紧张，进而减少氧需要量；还可以诱导出显著的 EMT 和中心肌内平滑肌样和成纤维细胞样细胞分化，改变沿着心室壁的机械力矢量，便于能量上更有利的收缩[10] [43]。

### 5.4. 细胞外囊泡

细胞间通讯和信号传导机制是由细胞外囊泡介导的，它可以促进心肌细胞增殖，导致收缩功能增强，因此细胞外囊泡是心外膜修复损伤心肌的重要组成部分[44]。通过使用非细胞源性细胞外囊泡(EVS)，可以恢复丢失的心肌，消除瘢痕，防止心力衰竭的进展。心外膜 EVS 能促进 H9C2 细胞和原代新生鼠心肌细胞的增殖，并能促进心肌细胞周期的再入，这些 EVS 还能促进冷冻损伤的工程人心肌(EHM)的再生。心肌细胞有效地摄取心外膜 EVS，通过激活 AKT 通路和部分激活 HIPPO 和 ERK 通路介导。研究表明，EVS 促心肌增殖的机制源于 EVS 中的特异性 miRNA 片段，经 EMT 激活的心外膜细胞中的 miRNA 含量显著增加，其 miRNA 的改变可能增加心肌增殖。因此，了解和靶向激活心外膜 EV 释放可能是治疗急性心肌梗死患者的一个治疗机会，需要进一步的研究来将这些发现外推到 MI 后的成人环境中。

## 6. 问题与展望

心脏损伤诱导心外膜及其衍生物增殖，从而调节组织修复。本文讨论了心外膜与心脏修复和再生的相关机制，包括心外膜的发育分化历程，转录因子和信号通路的研究，炎症因子的调制以及心外膜对心脏形成和发育的贡献，由此得出心外膜可能是心脏修复策略的关键靶点。

此外, 治疗策略的蓬勃发展也促进了心外膜基础研究快速向临床应用对接。现阶段, 临床心血管疾病仍有一些问题等待解决: ① 怎样诱导心外膜修复基因高效表达及维持表达产物的有效活性。② 怎样降低外来移植体在体内的免疫排斥问题。③ 改进移植策略及方法, 提高移植后心肌再生成活率。此外, 最近的研究发现了心外膜与损伤后炎症反应之间的一种重要但鲜为人知的相互作用, 这似乎强烈影响修复和功能恢复的结果。但由于它促进的多种有益作用, 心外膜仍是心脏再生中的中流砥柱。着眼于未来, 我们相信心外膜介导心肌再生的研究会更加深入明确, 为心肌再生之路注入新的力量。

## 基金项目

山东省中医药科技重点项目(Z-2022081)。

## 参考文献

- [1] Risebro, C.A., Vieira, J.M., Klotz, L., *et al.* (2015) Characterisation of the Human Embryonic and Foetal Epicardium during Heart Development. *Development*, **142**, 3630-3636. <https://doi.org/10.1242/dev.127621>
- [2] Ganassi, M., Zammit, P.S. and Hughes, S.M. (2021) Isolation of Myofibres and Culture of Muscle Stem Cells from Adult Zebrafish. *Bio-Protocol*, **11**, e4149. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4149>
- [3] Ramjee, V., Li, D., Manderfield, L.J., *et al.* (2017) Epicardial YAP/TAZ Orchestrate an Immunosuppressive Response Following Myocardial Infarction. *Journal of Clinical Investigation*, **127**, 899-911. <https://doi.org/10.1172/JCI88759>
- [4] Vagnozzi, R.J., Molkenin, J.D. and Houser, S.R. (2018) New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications. *Circulation Research*, **123**, 159-176. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311208>
- [5] Forte, E., Furtado, M.B. and Rosenthal, N. (2018) The Interstitium in Cardiac Repair: Role of the Immune-Stromal Cell Interplay. *Nature Reviews Cardiology*, **15**, 601-616. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0077-x>
- [6] Jang, J., Song, G., Pettit, S.M., *et al.* (2022) Epicardial HDAC3 Promotes Myocardial Growth through a Novel MicroRNA Pathway. *Circulation Research*, **131**, 151-164. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.320785>
- [7] Tandon, P., Wilczewski, C.M., Williams, C.E., *et al.* (2016) The Lhx9-Integrin Pathway Is Essential for Positioning of the Proepicardial Organ. *Development*, **143**, 831-840. <https://doi.org/10.1242/dev.129551>
- [8] Lie-Venema, H., van den Akker, N.M., Bax, N.A., *et al.* (2007) Origin, Fate, and Function of Epicardium-Derived Cells (EPDCs) in Normal and Abnormal Cardiac Development. *Scientific World Journal*, **7**, 1777-1798. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.294>
- [9] Bargehr, J., Ong, L.P., Colzani, M., *et al.* (2019) Epicardial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Augment Cardiomyocyte-Driven Heart Regeneration. *Nature Biotechnology*, **37**, 895-906. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0197-9>
- [10] Blom, J.N. and Feng, Q. (2018) Cardiac Repair by Epicardial EMT: Current Targets and a Potential Role for the Primary Cilium. *Pharmacology & Therapeutics*, **186**, 114-129. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.002>
- [11] Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., *et al.* (2010) Primary Contribution to Zebrafish Heart Regeneration by Gata4(+) Cardiomyocytes. *Nature*, **464**, 601-605. <https://doi.org/10.1038/nature08804>
- [12] Duim, S.N., Kurakula, K., Goumans, M.J., *et al.* (2015) Cardiac Endothelial Cells Express Wilms' Tumor-1: Wt1 Expression in the Developing, Adult and Infarcted Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **81**, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.007>
- [13] Tan, J.J., Guyette, J.P., Miki, K., *et al.* (2021) Human iPS-Derived Pre-Epicardial Cells Direct Cardiomyocyte Aggregation Expansion and Organization *in Vitro*. *Nature Communications*, **12**, Article No. 4997. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24921-z>
- [14] Rui, L., Yu, N., Hong, L., *et al.* (2014) Extending the Time Window of Mammalian Heart Regeneration by Thymosin Beta 4. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 2417-2424. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12421>
- [15] Pipes, G.T. and Yang, J. (2016) Cardioprotection by Thymosin Beta 4. *Vitamins and Hormones*, **102**, 209-226. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.04.004>
- [16] Rossdeutsch, A., Smart, N. and Riley, P.R. (2008) Thymosin beta4 and Ac-SDKP: Tools to Mend a Broken Heart. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, **86**, 29-35. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0243-9>
- [17] Maselli, D., Matos, R.S., Johnson, R.D., *et al.* (2022) Epicardial Slices: An Innovative 3D Organotypic Model to Study Epicardial Cell Physiology and Activation. *NPJ Regenerative Medicine*, **7**, Article No. 7.

- <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00202-7>
- [18] Rao, K.S. and Spees, J.L. (2017) Harnessing Epicardial Progenitor Cells and Their Derivatives for Rescue and Repair of Cardiac Tissue after Myocardial Infarction. *Current Molecular Biology Reports*, **3**, 149-158. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0066-6>
- [19] Wang, Y.L., Yu, S.N., Shen, H.R., *et al.* (2021) Thymosin beta4 Released from Functionalized Self-Assembling Peptide Activates Epicardium and Enhances Repair of Infarcted Myocardium. *Theranostics*, **11**, 4262-4280. <https://doi.org/10.7150/thno.52309>
- [20] Smart, N., Risebro, C.A., Melville, A.A., *et al.* (2007) Thymosin beta-4 Is Essential for Coronary Vessel Development and Promotes Neovascularization via Adult Epicardium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1112**, 171-188. <https://doi.org/10.1196/annals.1415.000>
- [21] Rao, K.S., Kloppenburg, J.E., Marquis, T., *et al.* (2022) CTGF-D4 Amplifies LRP6 Signaling to Promote Grafts of Adult Epicardial-Derived Cells That Improve Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Stem Cells*, **40**, 204-214. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxab016>
- [22] Duan, J., Gherghe, C., Liu, D., *et al.* (2012) Wnt1/Betacatenin Injury Response Activates the Epicardium and Cardiac Fibroblasts to Promote Cardiac Repair. *EMBO Journal*, **31**, 429-442. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.418>
- [23] Picelli, S., Bjorklund, A.K., Faridani, O.R., *et al.* (2013) Smart-seq2 for Sensitive Full-Length Transcriptome Profiling in Single Cells. *Nature Methods*, **10**, 1096-1098. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2639>
- [24] Fan, J., Salathia, N., Liu, R., *et al.* (2016) Characterizing Transcriptional Heterogeneity through Pathway and Gene Set Overdispersion Analysis. *Nature Methods*, **13**, 241-244. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3734>
- [25] Weinberger, M., Simões, F.C., Patient, R., *et al.* (2020) Functional Heterogeneity within the Developing Zebrafish Epicardium. *Developmental Cell*, **52**, 574-590. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.023>
- [26] Wang, J., Cao, J., Dickson, A.L., *et al.* (2015) Epicardial Regeneration Is Guided by Cardiac Outflow Tract and Hedgehog Signalling. *Nature*, **522**, 226-230. <https://doi.org/10.1038/nature14325>
- [27] Terriente, J., Gerety, S.S., Watanabe-Asaka, T., *et al.* (2012) Signalling from Hindbrain Boundaries Regulates Neuronal Clustering That Patterns Neurogenesis. *Development*, **139**, 2978-2987. <https://doi.org/10.1242/dev.080135>
- [28] Rodriguez-Meira, A., Buck, G., Clark, S.A., *et al.* (2019) Unravelling Intratumoral Heterogeneity through High-Sensitivity Single-Cell Mutational Analysis and Parallel RNA Sequencing. *Molecular Cell*, **73**, 1292-1305. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.009>
- [29] Huang, G.N., Thatcher, J.E., McAnally, J., *et al.* (2012) C/EBP Transcription Factors Mediate Epicardial Activation during Heart Development and Injury. *Science*, **338**, 1599-1603. <https://doi.org/10.1126/science.1229765>
- [30] Bertrand, J.Y., Kim, A.D., Teng, S., *et al.* (2008) CD41+ cmyb+ Precursors Colonize the Zebrafish Pronephros by a Novel Migration Route to Initiate Adult Hematopoiesis. *Development*, **135**, 1853-1862. <https://doi.org/10.1242/dev.015297>
- [31] Valentin, G., Haas, P. and Gilmour, D. (2007) The Chemokine SDF1a Coordinates Tissue Migration through the Spatially Restricted Activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Current Biology*, **17**, 1026-1031. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.020>
- [32] Euler, G. (2015) Good and Bad Sides of TGF $\beta$ -Signaling in Myocardial Infarction. *Frontiers in Physiology*, **6**, 66. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00066>
- [33] Dronkers, E., Wauters, M., Goumans, M.J., *et al.* (2020) Epicardial TGFbeta and BMP Signaling in Cardiac Regeneration: What Lesson Can We Learn from the Developing Heart? *Biomolecules*, **10**, Article No. 404. <https://doi.org/10.3390/biom10030404>
- [34] Wu, J., Jackson-Weaver, O. and Xu, J. (2018) The TGFbeta Superfamily in Cardiac Dysfunction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **50**, 323-335. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy007>
- [35] Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., *et al.* (2015) Latent TGF- $\beta$ -Binding Proteins. *Matrix Biology*, **47**, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.005>
- [36] 陈玖玲. PDGFR $\beta$  信号通路调节心外膜功能及心脏再生的机制研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [37] Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., *et al.* (2010) PDGF Signaling Is Required for Epicardial Function and Blood Vessel Formation in Regenerating Zebrafish Hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 17206-17210. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915016107>
- [38] Bruton, F.A., Kaveh, A., Ross-Stewart, K.M., *et al.* (2022) Macrophages Trigger Cardiomyocyte Proliferation by Increasing Epicardial Vegfaa Expression during Larval Zebrafish Heart Regeneration. *Developmental Cell*, **57**, 1512-1528. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.05.014>
- [39] Lamouille, S., Xu, J. and Derynck, R. (2014) Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Nature*

---

*Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

- [40] Cavallero, S., Shen, H., Yi, C., *et al.* (2015) CXCL12 Signaling Is Essential for Maturation of the Ventricular Coronary Endothelial Plexus and Establishment of Functional Coronary Circulation. *Developmental Cell*, **33**, 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.018>
- [41] Jackson-Weaver, O., Ungvijanpunya, N., Yuan, Y., *et al.* (2020) PRMT1-p53 Pathway Controls Epicardial EMT and Invasion. *Cell Reports*, **31**, Article ID: 107739. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107739>
- [42] Guo, Z., Geng, M., Qin, L., *et al.* (2021) Epicardium-Derived Tbx18(+) CDCs Transplantation Improve Heart Function in Infarcted Mice. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **8**, Article ID: 744353. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.744353>
- [43] Xie, Y., Lampinen, M., Takala, J., *et al.* (2020) Epicardial Transplantation of Atrial Appendage Micrograft Patch Salvages Myocardium after Infarction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, **39**, 707-718. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.023>
- [44] Del, C.C., Liaw, N.Y., Gunadasa-Rohling, M., *et al.* (2022) Regenerative Potential of Epicardium-Derived Extracellular Vesicles Mediated by Conserved miRNA Transfer. *Cardiovascular Research*, **118**, 597-611. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab054>